

# ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ АКТИВНОСТИ И СЕЛЕКТИВНОСТИ СОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ

Е.С. Пустюльга, О.В. Грибовская, Е.М. Ермола,  
А.Н. Лапко, В.П. Голубович

*ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Минск*

**Введение.** Существует ряд заболеваний (системная красная волчанка, пиело- и гломерулонефрит, дилатационная кардиомиопатия), патогенез которых связан с гиперпродукцией аутоиммунных антител класса G.

В терапии данных заболеваний успешно применяется экстракорпоральный метод с использованием специфических иммуносорбентов [1].

Биоспецифическая сорбция применима для удаления из биологических жидкостей (плазмы, лимфы, крови) целевых токсических биомолекул различной молекулярной массы и природы при аутоиммунных, аллергических и др. заболеваниях.

Данный метод основан на элиминации объектов, участвующих в патологической цепи развития заболевания. В качестве удаляющего компонента используются биоселективные сорбенты.

При создании сорбентов одним из ключевых моментов в их разработке является выбор лигандов. Главными критериями, которым должны соответствовать лиганды, являются стабильность, устойчивость к химической и энзиматической деградации, специфичность к выбранным молекулам - мишеням.

В данной работе мы предприняли попытки дать оценку функциональным качествам найденных нами лигандов и их специфичности.

**Материалы и методы.** Исследуемые образцы сорбентов представляли собой матрицы с иммобилизованными на них лигандами. В качестве матриц выступали полиэтиленовые гранулы с привитой акриловой кислотой и полиакриламидный гидрогель. В качестве лигандов – ди- и трипептиды, содержащие ароматические аминокислоты.

Оценку связывания полученных образцов сорбентов с IgG проводили иммуноферментным анализом [2]. Для этого в качестве иммуноферментной тест-системы был использован набор «IgG общий – ИФА – БЕСТ» фирмы «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия), предназначенный для иммуноферментного определения концентраций общего IgG в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека.

Для определения степени связывания полученных сорбентов с Fc-фрагментом общего IgG использовали твердофазный метод иммуноанализа, основанный на принципе «сэндвич».

Непосредственно перед проведением анализа изготовленные образцы сорбентов, а также активированные и не активированные матрицы, инкубировали при температуре 37°C в пробирках эппендорф с плазмой крови человека с использованием шейкера.

Дальнейший анализ проводили в две стадии. На первой стадии калибровочные образцы с известной концентрацией IgG и анализируемые образцы комплекса сорбент–Fc-фрагмент IgG, а также контрольные образцы (плазма и контрольные активированные и не активированные образцы матрицы без лигандов) инкубировались в лунках стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами (MAb) к IgG. Затем планшет отмывали промывочным буфером. На второй стадии связавшийся в лунках IgG и комплекс IgG-аминокислота обрабатывали конъюгатом MAb к легким (лямбда и каппа) цепям иммуноглобулинов человека с пероксидазой.

После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «иммобилизованные MAb–IgG–конъюгат» выявляли ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода.

Для определения степени связывания исследуемых образцов сорбентов с Fc-фрагментом общего IgM также использовали твердофазный метод иммуноанализа, основанный на принципе «сэндвич». Для этого в качестве иммуноферментной тест-системы был использован набор «IgM общий – ИФА – БЕСТ» фирмы «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия), предназначенный для иммуноферментного определения концентраций общего IgM в сыворотке крови и других биологических жидкостях человека.

Для оценки селективности сорбентов была взята величина отношения общего сорбированного IgG к общему количеству сорбированного белка. Количество белка в образцах определяли по методу Лоури [3]. Метод основывается на реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении реактива Фолина с образованием окрашенных продуктов.

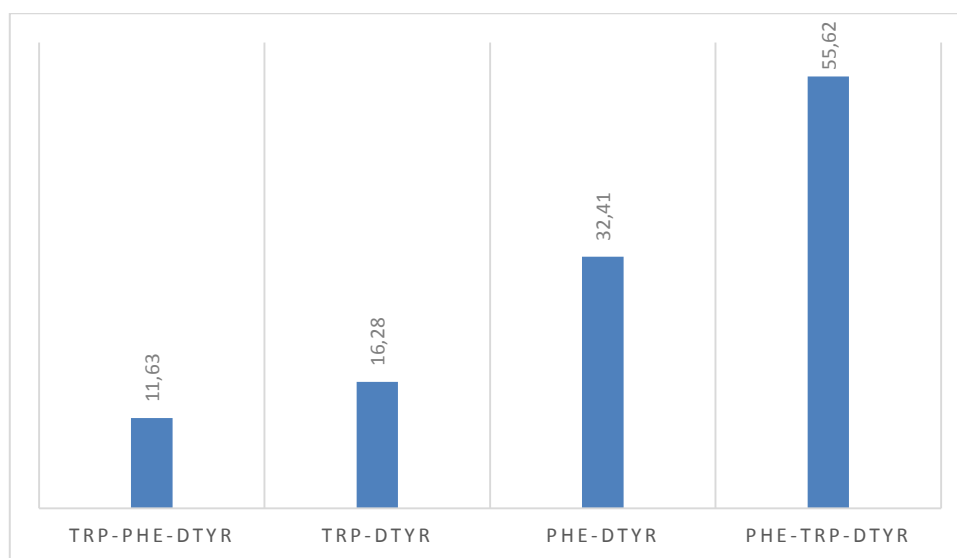
Интенсивность окраски образцов определяли по оптической плотности при длине волны 750 нм. Перед проведением анализа изготовленные образцы сорбентов инкубировали при температуре 37°C в пробирках эппендорф с плазмой крови человека с использованием шейкера.

**Результаты и обсуждение.** Для изготовления экспериментальных образцов сорбентов были выбраны следующие последовательности: 1) Trp-Phe-DTyr, 2) Phe-Trp-DTyr; 3) Trp-DTyr, 4) Phe-DTyr. В результате ряда иммуноферментных анализов мы получили результаты, свидетельствующие о том, что лиганды Phe-DTyr и Phe-Trp-DTyr показали высокий результат связывания IgG из биологических жидкостей: 32,41% и 55,62% соответственно.

При проведении оценки функции связывания полученных сорбентов на основе пептидных лигандов с Fc-фрагментом IgG в составе плазмы крови, с помощью ИФА мы установили, что сорбционная способность у всех четырёх предложенных нами образцов различна (Диаграмма 1). У трипептида Phe-Trp-DTyr сорбционная способность была наиболее высокой – 55,62%. Самой низкой сорбционной способностью обладает образец Trp-Phe-DTyr – 11,63%.

Также имеет место тот факт, что образцы сорбентов на основе лигандов с мотивом «Phe-...-D-Tyr» по результатам связывания IgG из биологических жидкостей почти вдвое превосходят сорбенты на основе лигандов с мотивом «Trp-...-D-Tyr».

Оценка селективности к общему белку проводилась на основании того факта, что метод Лоури определяет количество общего белка в растворе. Иммуноглобулины входят в состав белков плазмы крови, а это означает, что селективность можно определить как отношение количества сорбированного общего IgG к количеству сорбированного общего белка (Таблица).



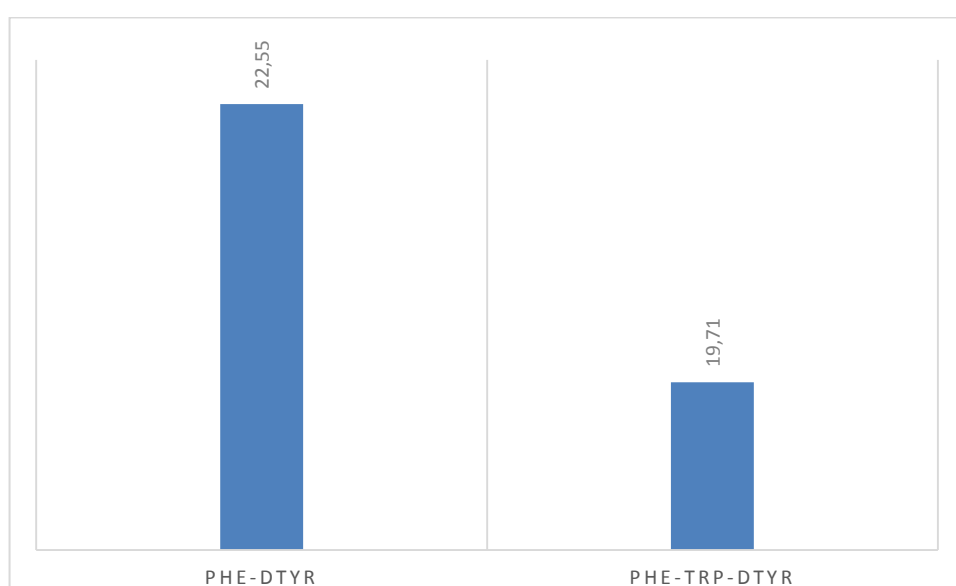
**Диаграмма 1. – Процентное количество сорбированного IgG**

**Таблица – Селективность образцов сорбентов**

Лиганд	Кол-во сорбированного белка (мг/мл)	Кол-во сорбированного общего IgG (мг/мл)	Селективность (%)
Trp-Phe-D-Tyr	1,97	1	50
Phe-D-Tyr	3,42	2,79	82
Trp-D-Tyr	3,38	1,4	41
Phe-Trp-D-Tyr	4,83	4,78	99

Из данных таблицы можно заключить, что не все сорбенты показали достаточно высокий результат по части селективности. Стоит отметить, что пептиды Phe-Tyr и Phe-Trp-Tyr (82% и 99% соответственно) показали наиболее высокий результат.

Также в нашем исследовании мы провели оценку активности к IgM двух образцов сорбентов (Phe-Trp-D-Tyr и Phe-D-Tyr), показавших наиболее высокий результат.



**Диаграмма 2. – Процентное количество сорбированного IgM**

На основании полученных данных можно заключить, что проявленная образцами активность к IgM в сравнении с активностью, проявленной к IgG, достаточно низкая и не может показать их высокую специфичность к данному классу иммуноглобулинов.

**Выводы.** Изготовленные нами образцы экспериментальных моделей сорбентов на основе ди- и три- пептидов ароматических аминокислот: 1) Trp-Phe-Tyr, 2) Phe-Trp-Tyr, 3) Trp-Tyr, 4) Phe-Tyr показали высокий результат связывания IgG из биологических жидкостей. По результатам иммуноферментного анализа образцы сорбентов на основании лиганда Trp-Phe-Tyr связали 1 мг IgG; Trp-Tyr – 1,4 мг; Phe-Tyr – 2,79 мг; Phe-Trp-Tyr – 4,78; что в процентном соотношении представляется: 11,63%, 16,28%, 32,41% и 55,62% соответственно.

Оценка селективности образцов экспериментальных моделей сорбентов показала, что образцы, изготовленные нами на основе ди- и трипептидов, высокоселективные. Сорбенты демонстрируют селективность от 40% (минимальный уровень) до 99% от всей массы белков в плазме.

Специфичность экспериментальных образцов к IgM достаточно низкая, в пределах 22,55% и может считаться удовлетворительной, учитывая тот факт, что целевым качеством сорбентов является высокая активность к IgG.

### **Список использованных источников**

1. Bosch, T. Therapeutic apheresis – state of the art in the year 2005 / T. Bosch // Ther. Apher. Dial. – 2005. – Vol. 9, № 6. – P. 459–468.
2. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров [и др.] – Москва: Высшая школа, 1991. – 288 с.
3. Lowry, O.H. Protein measurment with the folin phenol reagent / O.H. Lowry, N. J. Rosebrough, L. Farr, R.J. Randall // Journal of biological chemistry. – 1951. – Vol. 193 – P. 265-275